

На правах рукописи



НЕСТЕРОВА ОЛЬГА ЮРЬЕВНА

**БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАТИВНЫХ И
МОДИФИЦИРОВАННЫХ ФОРМ IgG НЕКОТОРЫХ
ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА ПСОВЫХ**

Специальность
03.00.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань - 2009

Работа выполнена на кафедре биохимии и биотехнологии
Государственного образовательного учреждения высшего
профессионального образования Удмуртский государственный
университет

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Барсуков Алексей Константинович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Коксин Владимир Петрович

доктор медицинских наук, профессор
Бутолин Евгений Германович

Ведущая организация: Учреждение российской академии наук
Институт высокомолекулярных соединений
РАН, г. Санкт-Петербург

Защита состоится «29» октября 2009 г. в 13 часов на заседании
диссертационного совета Д 212.081.08 при Казанском государственном
университете по адресу: 420008, Казань, ул. Кремлевская 18, аудитория 211.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И.
Лобачевского Казанского государственного университета им. В.И. Ульянова

Автореферат разослан «29» сентября 2009 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук



З.И. Абрамова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Прогресс в секвенировании нуклеиновых кислот позволил разработать исследовательский подход, на основании которого фактологию палеонтологии, сравнительной и онтогенетической биохимии, можно увязать с особенностями первичной структуры ДНК и, тем самым, корректно обсуждать время и направление молекулярной эволюции живых систем (Киселев, 2000). Функциональный подход к организации генома клетки предполагает перевод одномерного (линейного) кода ДНК в трехмерную структуру белка. При этом разнообразие белковых вариантов и всевозможных комплексов на их основе значительно больше количества генов, кодирующих их полипептидные цепи (Карелин, 2005). С учетом обобщенной проблематики, объемлющей направления исследований, касающихся полиморфизма генов, степени их консерватизма и закономерностей фолдинга, фундаментальная концепция «в гомологии структур зашифрована аналогия функций» оказалась весьма плодотворной и в настоящее время (Свердлов, 2000). Полагают, что принципиальные закономерности фолдинга в общих чертах будут раскрыты в ближайшие десятилетия, после чего останется еще масса неясных деталей. С методологических позиций секвенирование белков является более трудоемким процессом по сравнению с секвенированием нуклеиновых кислот и, следовательно, создание «каталога протеинов» отодвигается на неопределенно долгое время. Для достоверной реконструкции филогенетического древа необходимо в сравнительных исследованиях использовать информацию о первичной структуре 15-30 индивидуальных белков отдельных зоологических видов. Выяснение гомологии аминокислотных последовательностей, механизмов фолдинга и описания конформационно-нативной структуры макромолекулы представляют собой безусловные составляющие целесообразного развития молекулярной иммунологии. Вместе с тем, интегральные результаты таких сугубо биохимических (молекулярно-биологических) подходов малоинформативны для расшифровки структуры антигенных детерминант и антигенного строения индивидуального белка в целом. Использование для этих целей моноклональных антител в технологии эпитопного картирования информационно обеспечивает выяснение частностей. Так, например, с помощью моноклональных технологий идентифицированы подклассы IgG собаки (Mazza et al., 1994). Однако вопрос о четко дифференцированной первичной структуре отдельных подклассов IgG остается дискуссионно открытым (Schur, 1987; Furukawa et al., 1991; Robert, 2001). Отметим также, что всестороннее описание антигенной структуры функционально-сходных белков в ряду вид, род, семейство, отряд, класс выходит за рамки фундаментальной науки. Именно фундаментальная составляющая исследования биологических объектов и процессов обеспечивает безопасность научно-технических нововведений. В целом ряде обзоров и

оригинальных работ обсуждается комплексная проблематика использования функционально-сходных белков в качестве действующего начала фармацевтических биопрепаратов. Полагаем, что совершенствование методологии иммуноанализа позволит в объективных количественных критериях описать антигенную специфику функционально-сходных белков близкородственных видов. Для клинической практики такого рода исследования особенно актуальны (Burnouf et al., 2004; Trow et al., 2008; Mathews, 2008). Иммунологические подходы при исследовании белков иммуноглобулинового ряда используются, как правило, в рамках проблематики филогении и совершенствования систематики (Гельфранд, Любецкий, 2003). В настоящей работе обсуждаются результаты экспериментов, нацеленных на выявление иммунологического сродства IgG близкородственных видов, формирующих семейство псовых. Для обеспечения исследований с надлежащим уровнем качества разработана технология с учетом принципа адекватности метода и модели. В частности, создана лабораторная схема получения видовых IgG в электрофоретически гомогенной форме без олигомеров и фрагментов целевого белка. Именно очищенные и мономерные (в гель-хроматографии) формы IgG использованы для выявления иммунологического сродства среди животных (собака, песец и лиса) из семейства псовых. В последующей серии экспериментов изучалась возможность конструирования сополимерно модифицированных форм IgG собаки. Актуальность такого рода исследований обусловлена целесообразным развитием теории искусственных антигенов, методологии многоцелевой модификации и ориентацией полученных результатов на создание предметного задела для:

- технологического совершенствования производства инфекционно безопасных иммуноглобулиновых биопрепаратов с удлинённым периодом полувыведения;
- использования в клинической практике гетерологичных IgG без индукции нежелательного иммунного ответа.

Цель исследования – оценка антигенной гомологии видовых IgG на основе экспериментальных результатов, полученных с помощью иммуноанализа (IgG - анти IgG собаки). Получение и характеристика модифицированных совналом образцов IgG собаки в зависимости от степени модификации белка сополимером.

Задачи исследования:

В связи с поставленной целью решались следующие задачи:

- 1) Разработать лабораторную схему препаративной наработки IgG некоторых представителей из семейства псовых в электрофоретически гомогенной и конформационно нативной (хроматографически мономерной) форме.
- 2) Оптимизировать методы ИФА для индикации IgG собаки и выявления антител в составе специфического IgG собаки.
- 3) Провести сравнительное исследование антигенных свойств видовых IgG из семейства псовых.

4) Синтезировать сополимерно-модифицированные формы IgG собаки (химерные комплексы), изучить некоторые биохимические и биологические свойства химерных комплексов IgG собаки.

Научная новизна.

Создана универсальная исследовательская технология получения биохимически гомогенных и конформационно нативных форм IgG. Предложен адекватный методологический подход для описания антигенных характеристик IgG животных, принадлежащих одному и тому же семейству. Впервые в объективных количественных критериях выявлены различия антигенного строения при сравнении образцов IgG собаки, песца и лисы. Оптимизирована реакция поликонденсации в системе взаимодействия IgG с активированной формой совиала (сополимер винилпирролидона с диацеталем акролеина). Показана относительная резистентность сополимерно модифицированных форм IgG собаки к физико-химическим факторам с выраженным денатурирующим эффектом. Не установлен избирательный эффект модификации IgG совиалем. Есть основания полагать, что сополимерная матрица экранирует N –терминал и Fab-фрагменты IgG. Нативные формы IgG собаки и IgG песца, или сополимерно модифицированные IgG собаки не вызывают индукции биосинтеза антител при их внутримышечном введении собакам и песцам. Установлено также, что иммуногенный потенциал сополимерно модифицированных IgG понижается с увеличением мольного избытка совиала в химерном комплексе.

Практическая значимость.

Результаты исследования послужили основой для разработки, согласования и утверждения в соответствии с порядком, действующим в РФ, нормативно-технической и технологической документации на производство и исследование экспериментальных серий иммуноглобулинового биопрепарата: технические условия на препарат «Иммуно С» (ТУ 9382-002-43683877-03); технологический регламент производства на препарат «Иммуно С» (№001516-ОП); наставление по применению препарата «Иммуно С» (№ 13-4-03/0690; №001516-ОП от 6 марта 2003 г.).

В рамках университетско-академического кластера в гермозоне GMP на заводских площадях организовано серийное производство экспериментальных серий препарата «Иммуно С» в рамках требований широких производственных испытаний (федеральный аттестат № 886 от 2 апреля 2003 года), продукция сертифицирована (№ РОСС RU. ФБ01. В08840). Из заключения ФГУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» следует, что по совокупным показателям качества препарату «Иммуно С» аналогов в России нет.

Положения, выносимые на защиту:

1. Исследовательская технология лабораторного производства видовых IgG семейства псовых.
2. Методология выявления антигенных различий видовых IgG из семейства псовых.

3. Модификация IgG сополимером винилпирролидона с диацеталем акролеина и изучение свойств модифицированного белка.

Апробация работы.

Результаты исследований представлены на Региональной конференции биохимиков Урала, Поволжья и Западной Сибири, 20-21 сентября 2001 г., г. Ижевск; на 5-ой Российской университетско-академической научно-практической конференции, г. Ижевск, 2001 г.; на 6-ой Российской университетско-академической научно-практической конференции, г. Ижевск, 2003 г.; на I съезде физиологов СНГ, Сочи, 2005; на Международной конференции инженерного образования, 25-29 июля 2005 г., г. Гливиц (Польша); на XIX Международной научно-технической конференции «Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии», Уфа, 2006; на Третьей международной научно-практической конференции «Исследование разработка и применение высоких технологий в промышленности», Санкт-Петербург, 2007; на Четвертой международной научно-практической конференции «Исследование, разработка и применение высоких технологий в промышленности», Санкт-Петербург, 2007; на VI конференции иммунологов Урала, Ижевск, 2007.

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 11 научных работ. В соответствии с порядком, действующим в РФ, разработан, согласован и утвержден комплект нормативно-технической и технологической документации на ветеринарный иммуноглобулиновый препарат нового поколения «Иммуно С», включающий технические условия ТУ (ТУ 9382-002-43683877-03), технологический регламент производства на препарат «Иммуно С» (№001516-ОП) и наставление по применению препарата «Иммуно С» (№ 13-4-03/0690; №001516-ОП от 6 марта 2003 г.).

Структура и объем диссертации.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследований, их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 134 страницах машинописного текста, содержит 10 рисунков и 19 таблиц. Список использованной литературы включает 216 наименований.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Из сывороток крови собаки (*Canis familiaris*), песца (*Alopex lagopus*), лисицы (*Vulpes vulpes*), норки (*Mustela lutreola*), человека (*Homo sapiens*), быка (*Bos taurus*), барана (*Ovis aries*), лошади (*Equus caballus*), свиньи (*Sus scrofa*), крысы (*Rattus norvegicus*) и мыши (*Mus musculus*) выделяли IgG. На первой стадии фракционирования использовали осаждение полиэтиленгликолем (ПЭГ 4000) для получения фракций, обогащенных IgG или альбумином. Хроматографическое фракционирование осуществляли с использованием селективных сорбентов: аффинные - протеин А-сефароза CL 6B «Pharmacia» (Швеция), голубая сефароза CL 6B «Pharmacia» (Швеция); гидрофобные - бутил-тойоперл «Toyo Soda» (Япония), фенил-сефароза «Pharmacia» (Швеция); ионообменные - DE-52, CM-32 «Whatman»

(Великобритания). Хроматографию выполняли в колоночном варианте на основе обобщенных методологических принципов (Остерман, 1983) и рекомендаций фирм-изготовителей хроматографических сорбентов. На заключительной стадии всегда использовали эксклюзионную хроматографию на геле сефадекс G-200 «Pharmacia» (Швеция). Процент чистоты оценивали электрофорезом в градиентном 5-25% ПААГ в нативных и восстанавливающих условиях с последующим денситометрированием гелей на приборе ImageScanner «Amersham Biosciences» (Великобритания) в красном свете. Наличие примесных белков в полупродуктах и конечных продуктах выявляли также с помощью иммуноэлектрофореза по Грабару и Вильямсу в модификации Шейдеггера. Очищенные образцы целевых белков хранили при температуре $(8 \pm 2) ^\circ\text{C}$ в присутствии 50-70 % (от насыщения) сульфата аммония. В работе использовали стандартные образцы видовых IgG с 95-98 % чистоты.

Для получения антисыворотки, специфичной к IgG собаки, проводили иммунизацию беспородных кроликов высокоочищенным IgG собаки по схеме, предложенной Dresser D.W. Образцы индивидуальных иммуносывороток оценивали по титру и объединяли, если титр антиIgG собаки был в интервале 1/16-1/32 (Фримель, 1987). Пулированную иммуносыворотку проверяли на специфичность в иммуноэлектрофорезе по методологии Грабар и Вильямс с микромодификацией Шейдеггер (Фримель, 1987).

Выделение IgG из сыворотки крови кролика, специфичной к IgG собаки, осуществляли осаждением ПЭГ с последующими анионообменной (ДЭАЭ-целлюлоза) и эксклюзионной (сефадекс G-200) хроматографиями.

Конъюгацию IgG кролика с пероксидазой хрена (ПХ) осуществляли периодатным методом (Wilson, Nakane, 1978) с некоторыми модификациями. Полученный конъюгат стабилизировали и хранили в соответствии с рекомендациями (Montoya et al., 1987).

Иммунохимическое сходство IgG собаки с другими видовыми IgG определяли с помощью двойной радиальной иммунодиффузии (ДИД) по Ухтерлони, конкурентных и неконкурентных методов твердофазного иммуноферментного анализа (Егоров и др. 1991).

Исследовали влияние модификации сополимером N-винилпирролидона с диацеталем акролеина (совиаль) на биохимические, иммунохимические и иммунологические свойства IgG кролика, специфичного к IgG собаки. Реакционноспособные альдегидные группы в составе сополимера получали путем кислотного гидролиза акролеинового звена. Химическую модификацию иммуноглобулина проводили в условиях образования азометиновых связей между альдегидными группами сополимера и ϵ -аминогруппами лизина IgG (pH 9,5-9,6) в течение 2-12 часов при комнатной температуре, варьируя молярное соотношение компонентов IgG/совиаль от 1/2, 1/5, 1/10, 1/15, 1/20 при концентрации белка 5 мг/мл. В связи с нестабильностью азометиновых связей проводили восстановление боргидридом натрия. Фракционный состав модифицированного белка

анализировали методом электрофореза в градиентном ПААГ (5-25%) в диссоциирующих восстанавливающих условиях. Окраску белков проводили с использованием красителя Кумасси бриллиантовый голубой R-250 в концентрации 0,04 %.

Нативные и модифицированные формы IgG собаки сравнивали в иммунопреципитационном и иммуноферментном методах анализа.

Статистическая обработка данных по нескольким экспериментам проводилась согласно правилам вариационной статистики. Достоверность различий определяли, используя t-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение электрофоретически гомогенных и нативных (мономерных в гель-хроматографии) образцов IgG из плазмы (сыворотки) крови собаки, песца, лисицы.

С целью получения очищенных и конформационно нативных образцов IgG собаки, песца и лисицы использовали методы фракционирования с минимальным белок-денатурирующим эффектом. Исходно с помощью ПЭГ формировали фракции, обогащенные IgG. Нехроматографический осадок γ -глобулинов для дальнейших исследований растворяли в буфере с необходимым составом и ионной силой (табл. 1)

Таблица 1.

Оптимизация первой стадии хроматографической очистки иммуноглобулина G собаки, песца и лисы с использованием различных сорбентов.

Шифр стадии	Название сорбента	% чистоты	% выхода
0	Осадок γ -глобулинов, полученный с помощью ПЭГ	43-52	96 и более
1.1	Протеин-А сефароза (сорбция IgG-обогащенной фракции: 20 mM натрий-фосфатный буфер, pH 8,0; десорбции – 100 mM натрий-цитратный буфер pH 4,0; соотношение масса белка/объем сорбента не превышало 5 мг/мл)	90-97	80-85
1.2	Фенил-сефароза (сорбция IgG-обогащенной фракции: 80 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; десорбции – 0,15 M NaCl; соотношение масса белка/объем сорбента не превышало 5 мг/мл)	46-70	80-94
1.3	Бутил-тойоперл (сорбция IgG-обогащенной фракции: 120 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; десорбции – 0,15 M NaCl; соотношение масса белка/объем сорбента не превышало 5 мг/мл)	53-75	76-92
1.4	DE-52 (сорбция примесных белков из IgG-обогащенной фракции: pH 6,5, 0,0175 M натрий-фосфатный буфер; соотношение масса белка/объем сорбента не превышало 50 мг/мл)	80-95	60-83

Использование аффинного сорбента (протеин А-сефарозы) обеспечивало получение образцов IgG с максимальным уровнем чистоты (90-97 %) и приемлемым выходом целевого белка (80-95 %). Аналогичные

показатели получены с помощью анионообменной хроматографии в режиме сорбции примесных белков. Хроматография на основе гидрофобных сорбентов характеризовалась низкой селективностью (46-75 %) чистоты, а фенил-сефароза и неприемлемой сорбционной емкостью в отношении IgG (около 1 мг/мл сорбента). С учетом принципиально разных механизмов очистки IgG, свойственных аффинной и анионообменной хроматографиям, дальнейшую оптимизацию выделения целевого белка проводили в режиме сорбции примесных белков. За счет варьирования pH и ионной силы уравнивающего буферного раствора определяли условия, при которых из состава фракции (1.4, табл. 1), представленной на 80-95 % IgG, происходит сорбция гема и, по-видимому, белков, в т.ч. IgG, модифицированных гемом. Указанный эффект достигался при использовании 0,05 моль/л трис-HCl уравнивающего раствора, pH 8,5, в соотношении 200 мг стандартной IgG (80-95 % чистоты) на 1 мл сорбента. Таким образом, первая стадия анионообменной хроматографии (табл. 2) имеет своей задачей получение фракции IgG (2.2., табл.2) на уровне очистки целевого белка в пределах 80-95 %. Вторая (ключевая) стадия позволяет удалять из очищенной фракции IgG целевой и примесные белки, модифицированные гемом. Стадия эксклюзионной хроматографии (2.4., табл. 2) предназначена для выделения мономерных форм IgG без олигомеров и фрагментов целевых белков, в т.ч. без остаточных концентраций ПЭГ.

Таблица 2.

Характеристика лабораторной схемы выделения особо чистых форм видовых иммуноглобулинов G

Шифр стадии	Стадия	% чистоты	% выхода	Фактор очистки
2.1	Осаждение ПЭГ 15% pH 8,0	43-52	91-99	2,6-5,7
2.2	Анионообменная хроматография 1 (сорбция примесных белков: pH 6,5, 0,0175 М натрий-фосфатный буфер; соотношение масса белка/объем сорбента не превышало 50 мг/мл)	80-95	60-83	4,3-9,4
2.3	Анионообменная хроматография 2 (сорбции примесных белков: pH 8,5, 0,05 М трис-HCl буфер; соотношение масса белка/объем сорбента составляло 200 мг/мл)	90-98	46-73	4,9-9,6
2.4	Эксклюзионная хроматография	96-99	22-54	5,1-9,9

Определение качества иммуносывороток и конструирование лабораторного набора для индикации IgG собаки

Специфичность иммуносыворотки и сопряженного набора обеспечивали качеством иммуногена, схемой производства иммуносыворотки и системой контроля полученных иммунореагентов.

Серии контрольных проб, калибрантов и исследуемых образцов готовили из сульфатного концентрата целевых белков. Для этого аликвоты сульфатных суспензий IgG или альбумина вносили в 0,85 %-й раствор хлорида натрия до величины $ОП_{280} = 0,7$. Концентрацию IgG или альбумина определяли спектрофотометрически на основании мольного коэффициента поглощения с использованием эмпирических постоянных 1,4 и 0,66, соответственно, для IgG и альбумина. Далее необходимые концентрации образцов готовили с линейным инкрементом на основании шага 2.

В оптимизацию анализа входило определение стандартного разведения синтезированного ИПК. Для этого в течение ночи адсорбировали иммуноген (IgG собаки) при постоянной концентрации белка 1 мкг/мл общепринятым способом. Стандартным разведением ИПК антиIgG собаки считали такое его разведение, которое в прямом методе анализа обеспечивало формирование $ОП_{495} = 1,2 \pm 0,1$ с субстратом ОФД. На основе ИПК антиIgG собаки в стандартном разведении конструировали прямой метод иммуноферментного анализа. Растворы IgG с концентрацией белка 2,44 нг/мл – 10 мкг/мл подвергали адсорбционной иммобилизации с целью построения градуировочной зависимости. Контролем служили сывороточный альбумин собаки (10 мкг/мл) и видовые IgG (1,0 и 10,0 мкг/мл). Установлено, что чувствительность прямого варианта ИФА составляла 4,88 нг/мл, градуировочная зависимость находилась в интервале 4,88-625 нг/мл. При этом неспецифическая сорбция ИПК антиIgG собаки на адсорбционно иммобилизованный альбумин была в пределах нормы ($0,066 \pm 0,007$), а уровень специфических взаимодействий с видовыми IgG колебался в интервале от $1,125 \pm 0,129$ до $0,071 \pm 0,019$. Прямой метод анализа в аналитической биохимии самостоятельного значения не имеет. В настоящем исследовании полученные результаты прямой индикации IgG собаки и видовых образцов IgG служили основой для оптимизации прямого конкурентного метода и для выявления уровня гомологии видовых IgG среди животных одного и того же семейства.

Конкурентный метод ИФА обладает надлежащим уровнем специфичности. Максимальная специфичность анализа проявляется в условиях заданного лимита концентраций иммунореагентов в исходной реакционной среде. Указанный принцип соотношений аналитического иммуносорбента (IgG собаки) и детектирующего иммунореагента (ИПК антиIgG собаки) был использован при оптимизации прямого конкурентного метода ИФА. Концентрации калибрантов IgG собаки брали в интервале 2,44 – 5000 нг/мл. Установлено, что надлежащий наклон градуировочной зависимости находится в интервале концентраций конкурента 19,5 – 625 нг/мл. При этом концентрации сывороточного альбумина собаки 1, 10 и 100 мкг/мл не участвовали в конкуренции. Соответствующие оптические плотности образцов были на уровне холостой пробы, т.е. $ОП_{493}$ холостой пробы равна $1,113 \pm 0,102$, $ОП_{493}$ альбумина при концентрации белка 1, 10

мкг и 100 мкг/мл составили ($1,15 \pm 0,09$), ($1,23 \pm 0,11$) и ($1,22 \pm 0,15$), соответственно.

Влияние состава инкубационной среды на титр антител из класса IgG собаки

С целью разработки технологических нововведений исследовали влияние инкубационной среды различного состава на активность (титр) антител из класса G собаки, иммунизированной яичным альбумином. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3

Влияние состава среды и режима инкубирования на показатели титра антител из класса IgG собаки, специфичных к ЯА

№ п/п	Состав среды и условия инкубации	Титр антител в эксперименте	Удельный титр (расчетная величина)
1	0,8 % раствор риванола, pH 8,0 в течение 12 часов при температуре (10 ± 2) °C	54300	543
2	0,05 моль/л Na-ацетатном буферный раствор с 0,3 % каприловой кислоты при pH 5,0 в течение 12 часов при температуре (10 ± 2) °C	54300	543
3	0,05 моль/л Na-ацетатном буферный раствор с 0,3 % каприловой кислоты и 0,1 моль/л NaCl при pH 4,0 в течение 4 часов при температуре (18 ± 2) °C	54300	543
4	в 25 %-ном этаноле при pH 7,0 в течение 4 часов при температуре – 10 °C	54300	543
5	0,15 моль/л раствор натрия хлорида в течение 12 часов при температуре (10 ± 2) °C	54300	543

В пробирки, содержащие по 1 мл соответствующей инкубационной среды, вносили по 0,2 мл специфического IgG с концентрацией белка 100 мг/мл. При инкубировании с этанолом к 30 %-ному охлажденному раствору спирта (– 10 °C) приливали в тех же соотношениях раствор специфического IgG, охлажденного до ~ 0 °C.

При всех условиях инкубирования специфических IgG определяли титр антител непрямым методом иммуноферментного анализа и рассчитывали удельный титр – титр/белок. Согласно данным, представленным в таблице 3, различные условия, в которых проводилась инкубация, не влияют на

активность (количество) антител. В дальнейшем изложенные подходы были использованы в комплексном технологическом процессе производственного фракционирования плазмы крови псовых с целью разработки, согласования и утверждения в соответствии с порядком, действующим в России, нормативной документации на технологию производства препарата «Иммуно С».

Исследование антигенной структуры видовых IgG в гомологичной системе анализа (IgG собаки – антиIgG собаки)

При определении специфичности прямого метода индикации IgG собаки установлена достаточно высокая степень сродства ИПК антиIgGсобаки к IgG песца и лисицы. В меньшей степени ИПК антиIgG собаки взаимодействовал с IgG норки. Конкретные представители семейства псовых (волчьих), а именно собака, песец и лисица, выбраны с учетом экономических соображений (разводятся в неволе для производства пушнины). Следовательно, их боенская кровь, может использоваться для получения субстанций иммуноглобулинов, на основе которых возможно организовать промышленный выпуск гетерологичных препаратов с надлежащим уровнем биологической безопасности.

В сравнительных исследованиях образцов видовых IgG апробировались иммунопреципитационные и иммуноферментные методы анализа. Небольшие модификации в постановке иммунопреципитации касались использования в качестве связывающего агента IgG-фракции, выделенной из пула иммуносывороток, специфичных к IgG собаки. В состав агарозы вводили ПЭГ до концентрации 3 %, а преципитаты окрашивали с помощью амидочерного 4В. В прямом варианте ИФА в системе анализа IgG собаки - ИПК антиIgG собаки исследовали калибровочные пробы, приготовленные на основе видовых IgG. Гомологичный и гетерологичные калибранты использовали также в прямом конкурентном методе. Образцы сывороточного альбумина собаки служили контролем.

Установлено (табл. 4), что иммунопреципитационный анализ позволяет выявить антигенное сродство практически всех видовых IgG. При этом IgG собаки, песца и лисицы по результатам ДИД неразличимы. С целью устранения фоновых эффектов вместо иммуносыворотки в реакции преципитации мы использовали фракцию специфических IgG. Взаимодействие антиген – антитело регламентировали концентрацией специфического IgG (10 мг/мл) и концентрацией антигена 8-500 мкг/мл.

В прямом варианте ИФА (табл. 4, рис. 1) градуировочные зависимости воспроизводились для IgG собаки, песца и лисицы. Образцы IgG из семейства куньих (норка) также обладали сродством к ИПК анти-IgG собаки. Однако величины ОП₄₉₃ при концентрации адсорбционно иммобилизованных IgG 10 мкг/мл были на 10,0 % (песец), 19,9 % (лисица), 73,1 % (норка) ниже по сравнению с таковым показателем в гомологичной системе анализа. Другие видовые IgG связывали ИПК анти-IgG собаки на уровне контрольных величин. Заслуживает внимания факт параллельности градуировочных зависимостей в интервале концентраций 2,5 – 10 мкг/мл воспроизводимых

на образцах калибрантов семейства псовых (волчьих) (рис. 1). В методологической литературе интерпретация параллельности градуировочных зависимостей сводится либо к наличию структурно сходных либо идентичных антигенных детерминант.

При сравнении результатов исследований, полученных с помощью ДИД и прямого метода ИФА, наблюдается кажущееся несоответствие. В частности, чувствительность прямого ИФА составляет 4,88 нг/мл, чувствительность ДИД, как правило, на 3 порядка превышает аналогичный показатель при иммунопреципитации. Вместе с тем в ДИД зафиксировано иммунологическое сродство между, например, IgG собаки и IgG человека, а при использовании метода с большей чувствительностью результаты не столь очевидны (табл. 4). С позиций фундаментальной иммунологии взаимодействие с гетерологичными IgG возможно по двум структурно обусловленным обстоятельствам. Во-первых, одна и та же «гомогенная» популяция антител может реагировать с целым рядом не идентичных, но структурно сходным антигенных детерминант. В терминологии Tijssen (1985) такое иммунологическое взаимодействие характеризует индивидуальные белки как перекрестно реагирующие. Для белков, имеющих определенное количество идентичных антигенных детерминант, введен термин частичная перекрестная реактивность.

Иммуноперекрест, обусловленный структурно-сходными (не идентичными) антигенными детерминантами, графически представлен кривыми, параллельными линейной части градуировочных зависимостей, воспроизведенной в гомологичной системе конкурентного анализа. Полученные нами данные (табл. 4, рис. 2) свидетельствуют о смешанном типе перекреста. Так, непараллельность калибровочных графиков в области их линейности (рис. 2) на основе гомологичного и гетерологичных IgG животных из семейства псовых позволяет обсуждать наличие идентичных антигенных детерминант в составе IgG собаки, песца и лисицы. Гетерологичные IgG из семейства псовых не обеспечивают близких численных значений ОП в интервале концентраций гомолога 2,5 – 5,0 мкг/мл (табл. 4, рис. 2). Соответствующие ОП₄₉₃ при концентрации 5 мкг/мл видовых IgG из семейства псовых составили (0,21±0,02), (0,33±0,02) и (0,41±0,02), соответственно, для образцов собаки, песца и лисицы. При этом наиболее демонстративные результаты ОП₄₉₃, на основе которых воспроизводятся параллели градуировочных зависимостей, характерны для интервала концентраций IgG псовых от 1,5 до 5 мкг/мл. Очевидна также тенденция к конкуренции остальных IgG и прежде всего со стороны IgG норки (табл. 4, рис. 2). По-видимому, в условиях лимита концентрационных соотношений, предусмотренных условиями реакции, в составе ИПК антиIgG собаки будут присутствовать антитела к антигенным детерминантам гомолога, т.е. к антигенным детерминантам, которых нет в составе IgG песца и лисицы.

Идентификацию численных значений иммунологического сродства осуществляли с учетом градуировочных зависимостей, которые для прямого

и конкурентного варианта ИФА составили 4,88 - 625 нг/мл и 19,5 - 625 нг/мл, соответственно. В прямом методе ИФА иммунологическое сходство оценивали как отношение в % оптических плотностей гетерологичного и гомологичного антигенов при их постоянной концентрации 10 мкг/мл. В прямом конкурентном методе использовали линейную часть градуировочной зависимости 19,5 - 625 нг/мл. Разработанный нами лабораторный набор не в полной мере отвечал требованиям, предъявляемым к количественному анализу. Поэтому сравнивали различия оптических плотностей и их достоверность при одинаковых концентрациях видовых IgG (220 нг/мл), обеспечивающих 50% ингибирование за счет гомологичного IgG (табл. 4). . При сравнении одинаковых концентраций IgG песка и лисицы, соответствующих концентрации IgG собаки (220 нг/мл) и 50%-ому ингибированию в градуировочной зависимости, уровни сродства для гетерологичных образцов составили 84 и 65 %, соответственно.

Таблица 4

Уровень иммунологического сродства
видовых IgG животных в системе анализа (IgG - антиIgG собаки)

Животное	ДИД		Прямой ИФА, ОП _П		Конкурентный ИФА, ОП _К	
	титр	%	$x \pm \sigma$	%	$x \pm \sigma$	%
Собака	1/64	100	1,125 \pm 0,129	100	0,659 \pm 0,015**	100
Песец	1/64	100	1,063 \pm 0,082	90,0	0,748 \pm 0,048**	84
Лиса	1/64	100	0,892 \pm 0,073*	80,1	0,855 \pm 0,035**	65
Норка	1/16	25	0,347 \pm 0,043*	26,9	1,148 \pm 0,075**	12,5
Человек	1/8	12,5	0,176 \pm 0,023*	10,5	1,186 \pm 0,061	5,7
Бык	1/4	6,25	0,134 \pm 0,043*	6,5	1,177 \pm 0,076	7,3
Баран	1/4	6,25	0,154 \pm 0,062*	8,4	1,196 \pm 0,078	3,9
Лошадь	1/4	6,25	0,123 \pm 0,021*	5,5	1,179 \pm 0,076	7
Свинья	1/4	6,25	0,141 \pm 0,053*	7,0	1,195 \pm 0,097	4,1
Крыса	1/1 (цельная)	3	0,193 \pm 0,021*	12,2	1,188 \pm 0,121	3
Мышь	1/1 (цельная)	3	0,176 \pm 0,019*	10,5	1,201 \pm 0,089	3
фон			0,065 \pm 0,007 (САС, 10 мкг/мл)		1,218 \pm 0,137 (отсутствие конкурента)	

Примечание: X - ср. арифметическая, σ - среднее квадратичное отклонение, n=6;

ОП_П – оптическая плотность образцов при концентрации адсорбционно иммобилизованных IgG 10 мкг/мл; ОП_К – оптическая плотность образцов IgG при их постоянной концентрации (220 нг/мл), которая обеспечивает в гомологичной системе анализа (IgG собаки) ~50% ингибирование; * - достоверные различия по сравнению с гомологом (IgG собаки) при уровне

значимости $p < 0,05$; ** - достоверные различия по сравнению с фоном (отсутствие конкурентов) при уровне значимости $p < 0,05$.

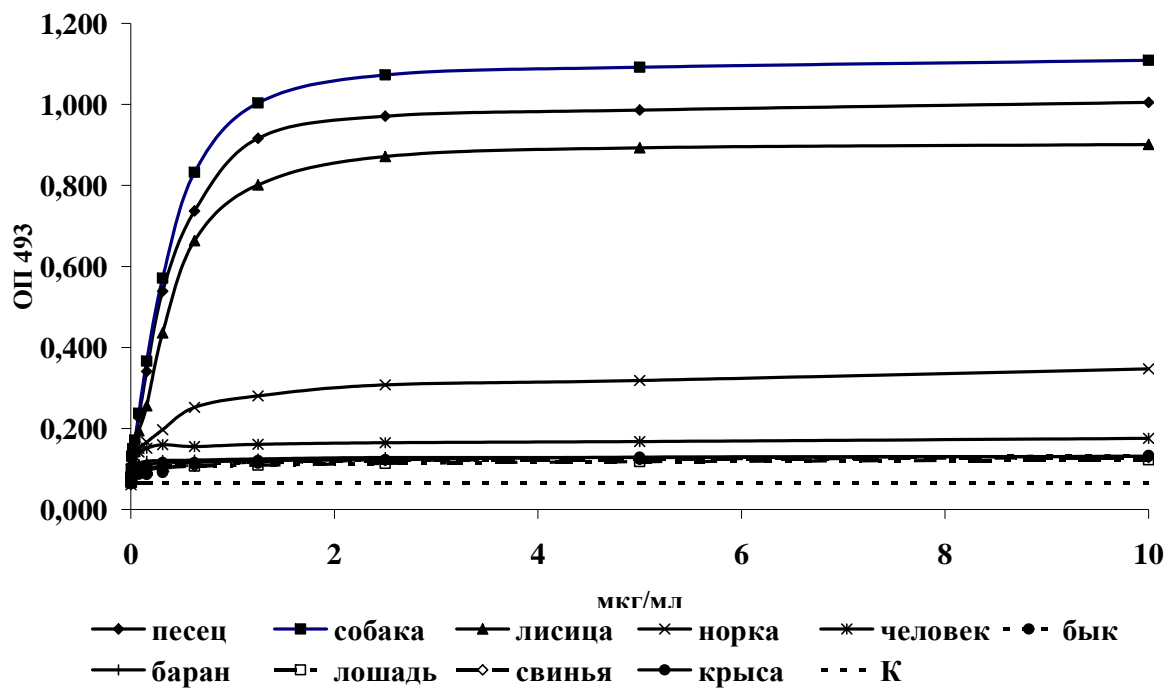


Рис. 1. Градуировочные зависимости гомологичных и гетерологичных IgG в прямом варианте ИФА

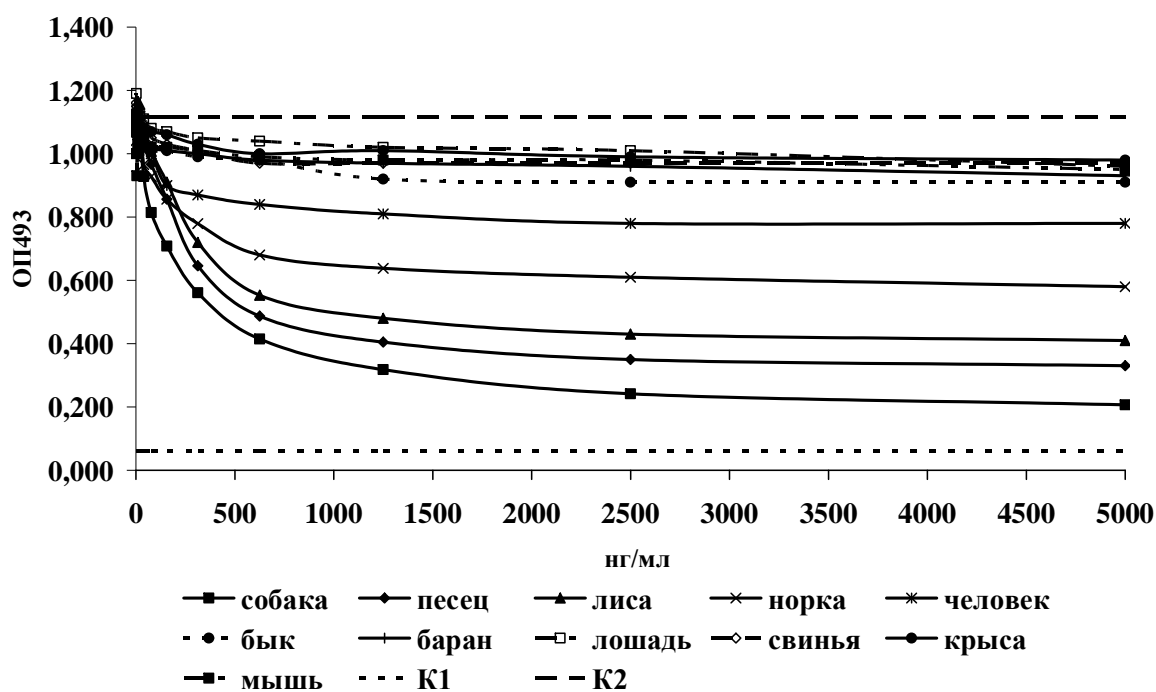


Рис. 2. Градуировочные зависимости гомологичных и гетерологичных IgG в прямом конкурентном варианте ИФА.

Оптимизация реакции сополимерной модификации IgG собаки

Активированную форму сополимера и образцы IgG собаки инкубировали при pH 9,5 в течение 1-18 часов. В процессе модификации определяли скорость изменения pH инкубационной среды через равные промежутки времени (табл. 5).

Таблица 5

Скорость изменения pH в процессе реакции модификации при различных соотношениях белок/полимер

Время реакции, час	Скорость снижения pH, ед./час				
	mod 1/2, $x \pm \sigma$	mod 1/5, $x \pm \sigma$	mod 1/10, $x \pm \sigma$	mod 1/15, $x \pm \sigma$	mod 1/20, $x \pm \sigma$
1-3	0,57±0,15	0,61±0,03	0,7±0,209	0,78±0,19	0,82±0,12
4-6	0,31±0,09	0,386±0,11	0,443±0,131	0,496±0,151	0,517±0,194
7-8	0,152±0,11	0,18±0,14	0,245±0,173	0,261±0,139	0,274±0,125

Примечание: mod – модифицированный IgG собаки с соответствующим соотношением белок/полимер; x – средняя арифметическая скорости; σ – стандартное отклонение.

Дальнейшие исследования были направлены на изучение физико-химических свойств модифицированных форм IgG при тех же мольных соотношениях белок/полимер. Оценивали мутность и вязкость растворов до и после модификации. Метод определения мутности основан на определении кажущего поглощения света с длиной волны 540 нм и относится к косвенным методам контроля за размерами молекул. Установлено, что мутность растворов возросла в 1,5 - 3 раза по мере увеличения избытка совиала. Тенденция к увеличению мутности говорит об увеличении средних молекулярных размеров конъюгатов по мере увеличения мольного избытка полимера. При этом вязкость раствора инкубационной среды возрастает незначительно: на 0,02-0,04 ед. при максимальных (1/15 и 1/20) мольных избытках модификатора.

В следующей серии экспериментов была предпринята попытка выделения сополимерно модифицированных форм IgG с помощью эксклюзионной хроматографии на гелях типа сефадекса G-200 (сефакрила S-200 или S-300). Установлено, что уже 2-кратный мольный избыток совиала изменяет профиль эксклюзионной хроматографии. Из-за структурных особенностей модификатора в наших исследованиях такой подход следует признать малоинформативным.

Для разработки метода оценки полноты реакции модификации на уровне соотношений нативная/модифицированная форма IgG использовали электрофорез в градиентном ПААГ (5-25 %). В аналитическом варианте электрофоретическому фракционированию подвергали восстановленные и невосстановленные пробы в диссоциирующих условиях. В диссоциирующих условиях невосстановленные пробы нативных и модифицированных IgG представлены на рисунке 3.

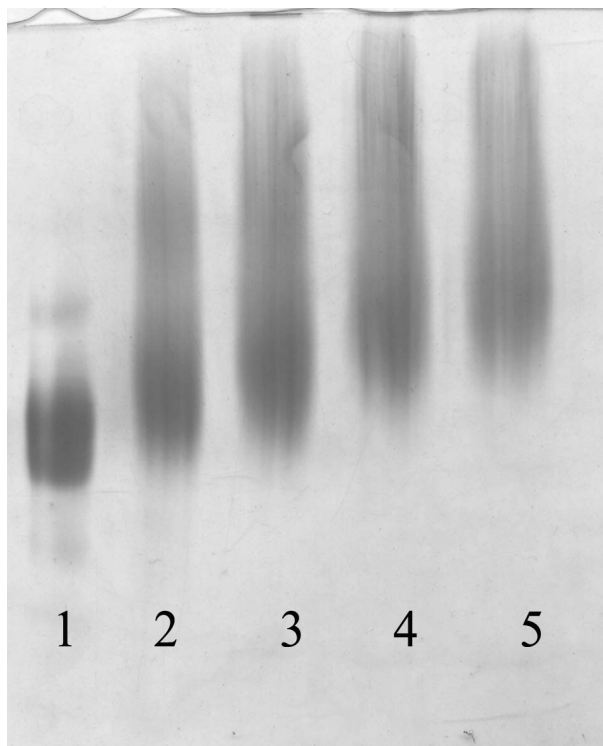


Рис. 3. Электрофореграмма образцов IgG: невосстановленные пробы (40 мкг) в диссоциирующих условиях:

1. Нативная форма IgG собаки;
2. Модифицированный IgG собаки, мольное соотношение белок:совиаль – 1:2;
3. Модифицированный IgG собаки, мольное соотношение белок:совиаль – 1:5;
4. Модифицированный IgG собаки, мольное соотношение белок:совиаль – 1:10;
5. Модифицированный IgG собаки, мольное соотношение белок:совиаль – 1:20.

В отличие от нативного образца модифицированные формы IgG представлены более широкой диффузной полосой в интервале от концентрирующего геля до области, близкой к подвижности немодифицированного белка. Заметно также, что модифицированные белки обладали меньшей электрофоретической подвижностью. Указанная закономерность зависела от мольного избытка совиала. Из электрофореграммы, приведенной на рис. 3, можно утверждать, что при мольном 20-кратном избытке, по-видимому, происходит наиболее полная модификация IgG (имеется ввиду отсутствие немодифицированных форм IgG).

В следующей серии экспериментов модифицированные формы IgG собаки подвергали электрофорезу в диссоциирующе-восстанавливающих условиях. Полученные электрофореграммы сканировали и результаты сканирования приведены в табл. 6. Количественный анализ полученных электрофореграмм показал, что уже при 2-х кратном избытке полимера большая часть белка оказывается модифицированной, при этом доля свободного иммуноглобулина составляет 39,7 % от общего количества IgG. С увеличением мольного соотношения белок/полимер до 1/20 наблюдается постепенное снижение доли свободного IgG и, соответственно, повышение доли высокомолекулярных комплексов в конъюгате.

Таблица 6

Соотношение нативной и модифицированной форм IgG собаки в зависимости от мольного соотношения белок/совиаль, %
(по результатам электрофореза в ПААГ в диссоциирующих восстанавливающих условиях)

Образцы с разным соотношением белок/полимер	Нативный IgG	Модифицированный IgG
Нативный IgG	98,1	1,9 (олигомеры)
1/2	39,7	60,3
1/5	28,4	71,6
1/10	7,1	92,8
1/15	6,7	93,3
1/20	6,4	93,6

Исследование биохимических и биологических свойств нативных и сополимерно модифицированных форм IgG собаки

Одним из следствий ковалентного связывания белка с полимерами является повышение их устойчивости термоинактивации или к условиям инкубирования с выраженным денатурирующим эффектом. В связи с изложенным, дальнейшие исследования касались изучения термостабильности конъюгатов. Нативный и модифицированный IgG в присутствии гентамицина (10 мг/мл) прогревали при 60 °С в течение 10 часов. В прогретых нативных образцах наблюдалась выраженная опалесценция и формирование осадка. Тогда как в образцах с модифицированными IgG опалесценции не наблюдалось. В отличие от нативной формы IgG модифицированные формы выдерживают термообработку даже при минимальном 2-х кратном избытке совиала.

Изменения антигенных свойств модифицированных образцов IgG собаки исследовали методом ДИД по Ухтерлони, используя специфичные IgG (антиIgG собаки) кролика. С увеличением степени модификации иммуноглобулина происходит закономерное понижение уровня антигенного сходства конъюгатов с нативным иммуноглобулином. Характерная для нативного IgG чувствительность иммуноанализа (64) при исследовании модифицированных образцов снижается. Так при 2-х и 5-ти кратных избытках совиала и наличия в составе IgG до 60,3 и 71,6 % модифицированных форм целевого белка чувствительность уменьшилась до титра 32. При 15-ти и 20-ти кратном избытке полимера исследуемый показатель снизился, соответственно, до 16 и 8.

В дальнейших исследованиях использовали прямой и прямой конкурентный ИФА. Результаты, представленные в табл. 7, показали, что по мере увеличения степени модификации IgG снижается уровень связывания ИПК антиIgG.

Таблица 7

Степень иммунохимического сходства нативного и модифицированных форм IgG собаки в прямом методе ИФА, в %

Соотношение белок/полимер	$x \pm \sigma$	P
Нативный IgG	100	-
Mod 1/2	$24,2 \pm 5,3$	$<0,001$
Mod 1/5	$18,52 \pm 2,7$	$<0,001$
Mod 1/10	$11,1 \pm 2,1$	$<0,001$
Mod 1/15	$2,5 \pm 1,9$	$<0,001$
Mod 1/20	0	$<0,001$

Примечание: n = 6; x – среднее арифметическое; σ - стандартное отклонение; P – достоверность различий.

Сополимер винилпирролидона с диацеталем акролеина является гидрофильной матрицей. Не исключено, что модифицированные формы IgG приобретают гидрофильные свойства и, как следствие этого, изменяется изотерма сорбции модифицированных образцов. С учетом изложенного, в следующей серии экспериментов нативный и модифицированный формы IgG исследовали прямым конкурентным методом (табл.8)

Таблица 8

Степень иммунохимического сходства нативного и модифицированных форм IgG собаки в прямом конкурентном ИФА, в %

Соотношение белок/полимер	Схема 1		Схема 2	
	$x \pm \sigma$	P	$x \pm \sigma$	P
Нативный IgG	100	-	100	-
Mod 1/2	$43,1 \pm 11,6$	$<0,05$	$48,7 \pm 5,3$	$<0,05$
Mod 1/5	$38,4 \pm 10,12$	$<0,05$	$46,24 \pm 4,79$	$<0,05$
Mod 1/10	$31,3 \pm 9,1$	$<0,05$	$43,0 \pm 12,3$	$<0,05$
Mod 1/15	$19,1 \pm 4,4$	$<0,05$	$23,7 \pm 6,5$	$<0,05$
Mod 1/20	$12,1 \pm 4,6$	$<0,05$	$17,0 \pm 8,0$	$<0,05$

Примечание: n = 6; x – среднее арифметическое; σ - стандартное отклонение; P – достоверность различий.

Из результатов, приведенных в табл. 8 следует, что при 2-х кратном мольном избытке совиала антигенное сродство IgG снижается на 56,9 %. При 20-ти кратном мольном избытке уровень антигенной гомологии модифицированного и нативного образцов IgG составил 12 %. Обнаруженные различия в уровнях антигенной гомологии модифицированных IgG (табл. 7 и 8) возможно объяснить методологией ИФА. Известно, что адсорбционная иммобилизация белков на поверхности твердой фазы обусловлена гидрофобными связями между белком и полистиролом. По-видимому, модификация IgG придает гидрофильные свойства белку, вследствие чего изотерма сорбции нативных и модифицированных образцов определяется различными количественными закономерностями. Следовательно, в конкурентном ИФА результаты исследования более адекватно отражают реальный уровень изменения антигенных свойств, обусловленных модификацией.

В следующей серии экспериментов изучали влияние модификации IgG, специфичного к яичному альбумину. Исследования выполняли с помощью непрямого метода ИФА, который проводили с помощью общепринятой схемы: адсорбционная иммобилизация яичного альбумина с последующей инкубацией нативной или модифицированных форм IgG собаки, специфичного к яичному альбумину, и индикация комплекса при помощи ИПК антиIgG собаки. Результаты исследования представлены в таблице 9.

Таблица 9

Антигенсвязывающая активность нативных и модифицированных IgG собаки, специфичных к яичному альбумину, до и после термоинактивации

Стадии исследования	ОП ₄₉₃ в не прямой схеме ИФА при концентрации IgG 625 мкг/мл, $\bar{x} \pm \sigma$					
	Nat	1/2	1/5	1/10	1/15	1/20
До инактивации	2,918 \pm 0,02	0,852 \pm 0,06	0,647 \pm 0,04	0,539 \pm 0,021	0,141 \pm 0,01	0,102 \pm 0,005
После инактивации	0,248 \pm 0,015	0,72 \pm 0,03	0,58 \pm 0,03	0,502 \pm 0,017	0,134 \pm 0,006	0,115 \pm 0,005
Остаточная активность (%)	8,5	84,5	89,6	93,1	95	112,7

Примечание: \bar{x} – среднее арифметическое; σ – стандартное отклонение; Р – достоверность различий.

Установлено, что с увеличением степени модификации закономерно снижается антигенсвязывающая активность IgG собаки, специфичного к яичному альбумину. При 15-20-ти кратном мольном избытке совиала антигенсвязывающая активность модифицированных IgG практически исчезает.

За антигенсвязывающую активность молекулы иммуноглобулина ответственны Fab-фрагменты, на конце которых сосредоточены

гипервариабельные участки полипептидной цепи. Отдельные аминокислотные остатки в этих участках специфически взаимодействуют с эпитопами антигена. Таким образом, уменьшение уровня антительной активности модифицированных форм IgG собаки, специфичных к яичному альбумину, по сравнению с их нативной формой свидетельствует о структурно-функциональных эффектах модификации в районе Fab-фрагмента молекулы иммуноглобулина, приводящее к экранированию части антигенсвязывающих участков или к нарушению их структуры. Кроме того, на антительную активность существенное влияние может оказать связывание полимера в районе Fc-фрагмента.

На основе полученных данных можно сделать вывод о том, что происходит увеличение стабильности IgG собаки, специфичного к яичному альбумину, в денатурирующих условиях в результате химической модификации. Это может быть связано с тем, что в процессе модификации в химерных молекулах происходит экранирование сайтов в области остатков лизина, аспарагина и глутамин, подвергающихся атаке гентамицина или других денатурирующих агентов.

Для исследования иммунобиологических свойств нативных и модифицированных форм IgG собаки осуществляли пассивную и активную иммунизацию собак, песцов и кроликов. При пассивной иммунизации нативные и модифицированные IgG собаки вводили внутримышечно собакам и песцам (животные-реципиенты). Активной иммунизации подвергали кроликов (животные-продуценты) в соответствии с рекомендациями Dresser (1987).

Образцы сывороток крови животных-реципиентов исследовали на 20-й и 40-й день после двухкратного введения нативных и модифицированных форм IgG. Образцы сывороток крови животных-продуцентов исследовали после первого цикла иммунизации. Наличие антител определяли в ДИД с добавлением в агарозу ПЭГ до конечной концентрации 3 %. Результаты представлены табл. 10

Таблица 10

Оценка потенциально возможной иммуногенности нативных и модифицированных форм IgG собаки на основе регистрации антител с помощью ДИД

IgG собаки, апробированные как потенциальные иммуногены	Животное-реципиент		Животное- продуцент
	песец	собака	кролик
IgG нативная форма	0	0	1/32
IgG модифицированная форма(IgG/совиаль)			
1/2	0	0	1/16
1/5	0	0	1/8
1/10	0	0	1/4
1/15	0	0	1/2
1/20	0	0	1/1 (цельная)

На основании полученных результатов полагаем, что модификация IgG собак сополимером винилпирролидона с диацеталем акролеина обеспечивает экранирующий эффект и не вызывает образование новых антигенных детерминант. Обобщающий вывод не противоречит теории искусственных иммуногенов, т.к. в составе использованного сополимера и синтезированного комплекса отсутствует иммуногенная составляющая типа цепных полимеров с электростатически заряженными функциональными группировками.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что 2-х стадийный хроматографический процесс, выполненный на слабом анионообменном сорбенте (типа DEAE) и эксклюзионная хроматография на геле типа сефадекс G-200 (S-200), обеспечивает изготовление электрофоретически гомогенных образцов IgG без олигомеров и фрагментов целевого белка.
2. Разработана исследовательская технология выявления антигенных свойств IgG среди животных из семейства псовых. Предлагается на основе электрофоретически гомогенных образцов в прямом и прямом конкурентном методах иммуноферментного анализа воспроизводить градуировочные зависимости и по контрольным точкам вычислять уровень иммунологического сродства.
3. Оптимизирована реакция поликонденсации на основе индукции альдегидных групп в составе сополимера винилпирролидона с диацеталем акролеина и свободных ε -аминогрупп лизина IgG. Отработана электрофоретическая система анализа для определения соотношений нативного и модифицированного IgG в составе конъюгированных форм.
4. Проведен биохимический скрининг модифицированных IgG, т.ч. определены закономерности экранирующего эффекта сополимерной матрицы на антигенное представительство и физиологическую активность антител.
5. Разработана, согласована и утверждена нормативно-техническая и технологическая документация в соответствии с порядком, действующим в РФ, на производство и исследование экспериментальных серий иммуноглобулинового биопрепарата «Иммуно С» нового поколения.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ

1. Барсуков А.К. К вопросу о совершенствовании технологии производства фармацевтических биопрепаратов / А.В Бармин, **О.Ю. Нестерова**, Е.Н. Желтышев, А.И. Кузнецов, О.В. Кожевникова, В.А. Грачева, Ф.М. Касимов, А.Н. Панин, В.И. Смоленский, В.И. Уласов// Сельскохозяйственная биология. – 2005. - № 6. – С. 84-91.
2. Барсуков А.К. Стандартизация биопрепаратов крови / А.В Бармин, Ф.М. Касимов, А.И. Кузнецов, **О.Ю. Нестерова**, Г.Н. Бурдов, А.Н. Панин, В.И. Смоленский, В.И. Уласов, В.Л. Свидерский, А.Е. Хованских// Ветеринария. – 2005. - № 7. – С. 43-48.

3. Barsukov A.K. Informational priority of international development of socially usefull biotechnology / Zhuravlev V.A., Savinsky S.S., Barmin A.V., Kuznetsov A.I., **Nesterova O.Yu.**, Kozhevnikova O.V., Ushnurtseva S.A., Zheltyshev E.N.// International Conference on Engineering Education. - Gliwice, Poland. 2005. – Conference Proceedings. – P. 76-81.
4. **Нестерова О.Ю.** Гомология IgG семейства псовых in vitro и in vivo / А.К. Барсуков, А.В. Бармин, Е.Н. Желтышев, А.И. Кузнецов, О.В. Кожевникова, Ф.М. Касимов., С.А. Ушнурцева // I съезда физиологов СНГ. Сборник научных трудов. – Сочи. 2005. – С. 87.
5. Барсуков А.К. Совершенствование технологии производства биопрепаратов крови / **О.Ю. Нестерова**, А.И. Кузнецов, Ф.М. Касимов, В.А. Журавлев, Е.Н. Желтышев, В.А. Храмов // XIX Международная научно-техническая конференция «Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии». Сборник материалов. – Уфа. 2006. – С. 54-55.
6. Барсуков А.К. Необходимые составляющие целесообразного развития нормативно-технической базы за контролем качества фармацевтических биопрепаратов / **О.Ю. Нестерова**, А.И. Кузнецов, О.В. Кожевникова, Е.Н. Желтышев, В.А. Храмов // Третья международная научно-практическая конференция «Исследование, разработка и применение высоких технологий в промышленности». Сборник трудов. - Санкт-Петербург. 2007. - С. 160-162.
7. Барсуков А.К. Биохимические основы технологии производства биопрепаратов из некондиционной (утильной) плазмы (сыворотки) крови / **О.Ю. Нестерова**, А.И. Кузнецов // Четвертая международная научно-практическая конференция «Исследование, разработка и применение высоких технологий в промышленности». Сборник трудов. - Санкт-Петербург. 2007. – С. 250-251.
8. Барсуков А.К. Исследование иммуногенеза, индуцированного нативными и сополимерно модифицированными формами IgG / **О.Ю. Нестерова**, А.И. Кузнецов // VI конференции иммунологов Урала. Материалы конференции. - Ижевск. 2007. – С.23-24.
9. Барсуков А.К. Выделение белков-стандартов иммуноглобулина G и альбумина, изучение их олигомеризации и антигенных свойств в процессе хранения в насыщенном растворе сульфата аммония / А.В. Бармин, А.И. Кузнецов, **О.Ю. Нестерова**, С.А. Ушнурцева, А.Н. Панин, В.И. Смоленский, В.И. Уласов, В.Л. Свидерский, А.Е. Хованских // Прикладная биохимия и микробиология.- 2009 г.- Т. 45.- №3.- С. 378-383.
10. Барсуков А.К. Разработка экспериментальных подходов на основе белков-стандартов для оценки качества биопрепаратов крови и иммунопероксидазных конъюгатов, специфичных к иммуноглобулинам G человека и животных / А.В. Бармин, А.И. Кузнецов, **О.Ю. Нестерова**, С.А. Ушнурцева, А.Н. Панин, В.И. Смоленский, В.И. Уласов, В.Л. Свидерский, А.Е. Хованских // Прикладная биохимия и микробиология.- 2009 г.- Т. 45.- №4.- С. 487-492.

11. Патент на изобретение № 2338375 «Способ хранения плазмы или сыворотки крови для получения иммуноглобулиновых и альбуминовых биопрепаратов».